

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 3130299	A	19910604	JP 90212952	A	19900808	199133 B

Abstract (Basic): JP 3130299 A

Peptide cpd. and its salts of formula (I): is claimed.  
 A-Leu-D-Trp(R')-D-Glu(OR2)-Ala (I) where A= D-Val or D-allo-Ile; R1 = H or amino protected radical; R2 = H or carboxyl protected radical  
 Culture of WS 7333 - producing bacteria belonging to Streptomyces sp. No. 7338, registered as No. 2550, and separation of WS 7333 substance, or cyclization of cpd. of formula (II),  
 H-A-Leu-D-Trp(R'a)-D-Glu(OR2a)-Ala-OH (II) or reactive deriv. of amino radical and/or carboxyl radical, or their salts, with optional elimination reaction of amino protected or/and carboxyl protected radical. In (II) A = D-Val or D-Allo-Ile; R1a = amino protected radical; R2a = carboxyl protected radical.

USE/ADVANTAGE - Endothelin antagonist contg. the peptide cpd. and its salts. (Provisional Basic previously advised in week 9128) (15pp Dwg.No.0/0)

Title Terms: NEW; PEPTIDE; PREPARATION; CULTURE; STREPTOMYCES; SPECIES; ANTAGONIST

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-037/24; C07K-001/02; C07K-007/64; C12N-001/20; C12P-021/04; C12R-001/46

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01A; B12-G01; D05-C11

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* D011 D013 D601 H1 H100 H181 H211 J0 J011 J012 J1 J171 J172 J371 M210  
 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M231 M232 M233 M262  
 M280 M281 M312 M313 M314 M315 M321 M332 M333 M340 M342 M343 M349  
 M371 M381 M391 M423 M510 M511 M520 M530 M540 M620 M630 M640 M650  
 M710 M903 M904 P617 Q233 V911 V923 V925 9133-14001-N

Generic Compound Numbers: 9133-14001-N

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-130299

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)6月4日

C 07 K 7/64

ZNA

8318-4H

C 12 N 1/02  
1/20

A

6807-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全15頁)

⑭発明の名称 ペプチド化合物とその製造法および用途

⑰特 願 平2-212952

⑱出 願 平2(1990)8月8日

優先権主張 ⑳1989年8月31日㉑イギリス(GB)㉒8919726.3

⑲発 明 者 橋 本 道 真 茨城県つくば市花畑3-26-9 三松フラワーマンション  
206号室

⑲発 明 者 西 川 元 章 茨城県つくば市梅園2-5-4 ニューライフ梅園405

⑲発 明 者 江 崎 正 美 茨城県つくば市並木3-17-1 ロイヤルコーボ304

⑲発 明 者 清 遠 純 夫 茨城県つくば市並木3-17-1 ロイヤルコーボ405

⑲発 明 者 奥 原 正 国 茨城県つくば市梅園2-14-10

⑲発 明 者 高 瀬 茂 弘 茨城県つくば市梅園2-15-2-205

⑲出 願 人 藤沢薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

⑲代 理 人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

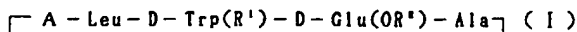
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ペプチド化合物とその製造法および用途

## 2. 特許請求の範囲

## 1. 式:



(式中、AはD-Val基またはD-allo-Ile基、

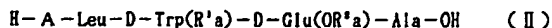
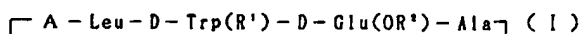
R<sup>1</sup>は水素原子またはアミノ保護基、R<sup>2</sup>は水素原子またはカルボキシ保護基を意味する)

で示されるペプチド化合物およびその塩類。

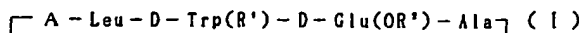
2. R<sup>1</sup>が水素原子または低級アルカノイル基、R<sup>2</sup>が水素原子またはアル(低級)アルキル基である請求項1記載の化合物。3. R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>が水素原子である請求項1または2に記載の化合物。

4. ストレプトミセス属に属するWS7338物質産生菌株を培地中で培養し、得られた培養物からWS7338物質を分離、採取することからなるWS7338物質の製造法。

## 5. 式:

(式中、AはD-Val基またはD-Allo-Ile基、R<sup>1a</sup>はアミノ保護基、R<sup>2a</sup>はカルボキシ保護基を意味する)で示される化合物またはアミノ基及び/またはカルボキシ基における反応性誘導体あるいはそれらの塩類を開環反応に付し、必要に応じてアミノ保護基及び/またはカルボキシ保護基の脱離反応に付すことからなる式:(式中、Aは上記と同一意味、R<sup>1</sup>は水素原子またはアミノ保護基、R<sup>2</sup>は水素原子またはカルボキシ保護基を意味する)で示される化合物またはその塩の製造法。

## 6. 式:



(式中、AはD-Val基またはD-allo-Ile基、

R<sup>1</sup>は水素原子またはアミノ保護基、R<sup>2</sup>は水素原子またはカルボキシ保護基を意味する)

で示されるペプチド化合物およびその塩類を有効成分として含有することとなるエンドセリン拮抗剤。

7. ストレプトミセス (*Streptomyces*) sp. No. 7338 (微工研条寄第2550号)の生物学的純粋培養物。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (イ) 産業上の利用分野

この発明は、新規なペプチド化合物とその製造法および用途に関する。より詳しくは、この発明は、生理活性ことにエンドセリン拮抗作用を有する新規なペプチド構造を有する抗生物質およびその同族体、それらの製造法ならびにそれらを含む医薬製剤に関する。

(ロ) 従来の技術と発明によって解決されるべき課題

高血圧、脳卒中に対する治療薬、ぜんそくに対する治療薬などについて、種々の合成薬が開発さ

れている。しかし、より強力で副作用の少ない薬の開発が望まれている。

一方、最近血管内皮細胞からエンドセリンが見出され、このものは血管収縮作用を示す他に、体内で多彩な作用を示す物質であることが判明してきている。

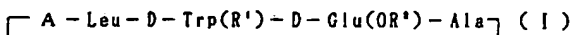
#### (ハ) 課題を解決するための手段

この発明の発明者らは、生理活性を示す抗生物質の研究を種々に行なった結果、ストレプトミセス属に属する菌の培養物からWS7338物質と名付けた物質を単離した。

この単離物質の構造解明ならびに合成法の検討を行なうとともに、薬理作用の研究を重ねた結果、この発明を完成するに至った。

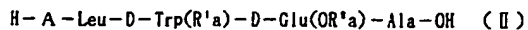
かくして、この発明は、ストレプトミセス属に属する培養物からWS7338物質を分離、採取することからなるWS7338物質を得る方法を提供するものである。なお、WS7338物質は、この発明で付けられた略称で、WS7338A物質とWS7338B物質とからなる。

また、この発明によれば、式：



(式中、AはD-Val基またはD-allo-Ile基、R<sup>1</sup>は水素原子またはアミノ保護基、R<sup>2</sup>は水素原子またはカルボキシ保護基を意味する)で示されるペプチド化合物およびその塩類ならびにこれらを含むエンドセリン拮抗剤が提供される。

さらに、この発明は、式：



(式中、Aは上記と同じ意味、R<sup>1</sup>aはアミノ保護基、R<sup>2</sup>aはカルボキシ保護基を意味する)で示される化合物またはアミノ基および/またはカルボキシ基における反応性誘導体あるいはそれらの塩類を開環反応に付し、必要に応じてアミノ保護基および/またはカルボキシ保護基の脱離反応を付すこととなる式(I)の化合物またはその塩の製造法を提供するものである。

#### [培養によるWS7338物質の産生]

WS7338物質は、培地中でストレプトミセス属に属するWS7338産生菌株を培養することにより生産することができる。ストレプトミセス属に属するWS7338産生菌株としては、北海道夕張市で採取した土壌から分離したストレプトミセスNo.7338菌株が挙げられる。この菌株の凍結乾燥サンプルは、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-2250として1989年8月11日に寄託されている。この発明のWS7338産生菌株は、上記の菌株に限定されず、たとえばその天然変異株ならびに人工変異株であってもよい。人工変異株は、X線照射、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン、2-アミノプリンなどでの処理のような常法によって作ることができる。

ストレプトミセス7338菌株は、次の形態学的、培養上、生物学的および生理学的特性を有する。

#### (i) 形態学的特性

分類学上の検討には、シャーリングとゴットリーブの方法 (Stirling, E. B. and P. Gottlieb:

Methods for characterization of *Streptomyces* species, International Journal of Systematic Bacteriology, 16, 313-340, 1966) を用いた。

菌株を酵母エキス・麦芽エキス寒天培地、無機塩・澱粉寒天培地およびグリセリン・アスパラギン寒天培地上で30℃、14日間に培養して、その培養物を光学顕微鏡と電子顕微鏡で形態学上の観察を行なう。

栄養菌糸は、分裂なくよく発達。気菌糸は、単茎性に分枝し、鎖当り20以上の胞子を有するゆるやかならせん状胞子鎖及び直曲状鎖を形成。胞子は平滑面を有し、0.5~0.7×1.0~1.3μmの大きさの円筒形、硬化顆粒、胞子嚢と遊走子は観察されず。

#### (ii) 培養上の特性

培養上の特性は、上記シャーリングとブットリープの方法及びワークスマンの方法 (Waksman, S. A.: The actinomycetes Vol. 2: Classification, identification and description of genera and species: The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961) で観察した。

培養は30℃で14日間行ない、色名は、メスウーイン ハンドブック オブ カラー (Kornerup, A. and J.H. Vanscher: Methuen Handbook of colour, Methuen, London, 1978) に従った。その結果を第1表に示す。

(以下余白)

第1表 7388菌株の培養上の特性

培 地	培養特性
酵母エキス・麦芽 エキス寒天培地	G: 良好
	A: 中等度、赤灰色 (7B2)
	R: 暗褐色 (7F6)
	S: 無し
オートミール寒天 培地	G: 中等度
	A: 少量、白色
	R: 淡黄色 (3A3)~赤褐色 (9E4)
	S: 無し
無機塩・澱粉 寒天培地	G: 良好
	A: 多量、白色
	R: 紫褐色 (11E4)~暗褐色 (9E6)
	S: 無し
グリセリン・アス パラギン寒天培地	G: 良好
	A: 中等度、赤灰色 (12C2)
	R: 紫褐色 (11F8)
	S: 淡褐色
ペプトン・酵母 エキス・鉄寒天 培地	G: 中等度
	A: 無し
	R: 灰褐色 (6B4)
	S: 無し
チロシン寒天 培地	G: 中等度
	A: 少量、淡灰色 (B2)
	R: 灰褐色 (8F3)
	S: 赤褐色 根跡
普通寒天培地	G: 中等度
	A: 無し
	R: 淡黄色 (3A3)
	S: 無し

略号: G=生育程度、A=気菌糸、R=菌叢裏面色、  
S=可溶性色素

気菌糸は、酵母エキス・麦芽エキス寒天培地及びグリセリン・アスパラギン寒天培地上では赤灰色であった。菌叢裏面色は酵母エキス・麦芽エキス寒天培地では暗褐色であり、オートミール寒天培地では赤褐色であった。この菌糸色素はpHに鋭敏ではなく、メラニン様色素は、ISP1培養液、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天培地及びチロシン寒天培地では生成されなかった。淡赤褐色色素はグリセリン・アスパラギン寒天培地及びチロシン寒天培地中に痕跡量みられる。この可溶性色素はpHに鋭敏で、0.05N塩酸の添加により褐色から黄色に僅かに変化し、0.05N水酸化ナトリウムの添加により、褐色からピンク色に変化する。

#### (iii) 細胞壁型

細胞壁の分析をベッカー等の方法 (Becker, B., M.P. Lechevalier, R.E. Gordon and H.A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: Microbiol., 12, 421-423, 1964) 及び山口氏の方

法 (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: J. Bacteriol., 89, 444-453, 1965) により行なった。

7338菌株の全細胞加水分解物を分析するとLL-ジアミノピメリン酸の存在を示した。従って、この菌株の細胞壁はI型として分類される。

#### (iv) 生物学的及び生理学的性質

WS 7338菌株の生理学的性質及び炭素源の利用については各第2表及び第3表に示す。

生育温度範囲は、温度勾配付恒温器 (アドヴァンテック トーヨー (株) 製) を用い、酵母・麦芽エキス寒天培地で測定した。

炭素源の利用はブリーダムとゴットリーブの方法 (Pridham, T.G. and D. Gottlieb: The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination: J. Bacteriol. 56: 107~114, 1948) により試験した。

上記のような分類学上の性質に基づいて、7338菌株はストレプトミセス属に属し、前記のブリーダムとトレスナーのグルーピングで灰色または赤色系の菌株であると考えられる。従って、この菌株をストレプトミセス sp. No. 7338菌株と命名した。

次に培養条件について記載する。

培養は、WS 7338産生菌株を、同化性の炭素源及び窒素源を含有する栄養培地中で好気性条件下で培養 (例えば、振盪培養、液内培養等) で行なうことができる。

好ましい炭素源としては、ブドウ糖、澱粉、蔗糖、果糖、グリセリン等のような炭水化物が挙げられる。

好ましい窒素源としては、酵母エキス、肉粉、ペプトン、グルテン粉、綿実粉、大豆粉、コーンステープリカー、乾燥酵母、小麦の麦芽、ジャガイモ蛋白等、並びにアンモニウム塩 (例えば、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等)、尿素、アミノ酸等のような無機及び

第2表 7338菌株の生理学的物質

条 件	特 性
生育温度範囲	11℃～35℃
生育最適温度	30℃
ゼラチンの液化	陰性
牛乳の凝固	〃
牛乳のペプトン化	〃
澱粉加水分解	陽性
メラニン様色素の生成	陰性
セルロースの分解	〃
硫化水素の生成	〃

第3表 7338菌株の炭素源の利用度

化合物	生 育
D-グルコース	+
シュクロース	+
D-キシロース	±
D-フルクトース	+
レ-ラムノース	-
ラフィノース	+
イノシトール	+
マニトール	+

+: よく利用される

±: 利用度は疑わしい

-: 利用されない

有機の窒素化合物が挙げられる。

炭素源と窒素源は、適宜組合わせて用いられるが、純品を用いることは必要とされない。これらは痕跡量の発育促進物質や相当量の無機栄養素を含むものであってもよい。

培地には、所望により、炭酸ナトリウムもしくはカルシウム、リン酸ナトリウムもしくはカリウム、塩化ナトリウムもしくはカリウム、ヨウ化ナトリウムもしくはカリウム、マグネシウム塩、銅塩、亜鉛塩、コバルト塩等のような無機塩を加えてもよい。

培地が発泡性の場合には、流動パラフィン、植物油、鉱物油またはシリコーンのような消泡剤を加えてもよい。

WS 7338物質の大量生産には、他の生理学的活性物質の大量生産法と同様に、通気液内培養が好ましい。なお、少量の生産には、フラスコ内での振盪培養が用いられる。

さらに大きいタンク内で培養を行なう時には、WS 7338物質の産生工程中で発育遅滞を避けるた

めに生産タンク中に接種用微生物の栄養細胞を接種するのが望ましい。従って、まず、微生物の細胞を比較的少量の培地に接種して培養し、微生物の栄養細胞を作り、ついで、培養した栄養細胞を大きなタンクに移すことが望ましい。栄養細胞を産生する培地は、WS7338物質の産生に用いられる培地と実質的に同一または異なってもよい。

培養混合物の攪拌及び通気は種々の方法で行うことができる。攪拌はプロペラもしくは同様な機械的攪拌装置の使用、醗酵槽の回転もしくは振盪、種々のポンプ装置の使用または培地中に滅菌した空気の導入等により行なうことができる。通気は、培養混合物中に滅菌空気を導入することにより行なうことができる。

醗酵は、通常約10℃～40℃、好ましくは20℃～30℃、約50～200時間で行われるが、醗酵の条件及び規模により変化させてもよい。

醗酵が完了した後、培養液からWS7338物質の分離、採取が行われる。その方法としては、生理活性物質の分離、採取に用いられる常法が利用で

きる。

この発明に従えば、WS7338物質は一般に濾過した培養液の中に見出される。従ってWS7338物質は濾過した培養液から適切な溶媒（例えばアセトン、酢酸エチル等）の単独もしくはそれらの混合溶媒による抽出で分離するのが好ましい。

この抽出液は、例えば少量になるまで蒸発または蒸留により濃縮し、得られた活性物質、即ちWS7338物質を含む残渣を通常の精製法、例えばクロマトグラフィーまたは適切な溶媒もしくは混合溶媒からの再結晶に付される。これによりWS7338物質の純品を得ることができる。

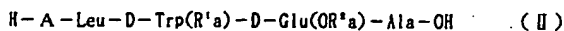
WS7338物質の物理化学的な性質や性状は実施例によって詳しく説明するが、その化学構造を検討した結果、WS7338A物質は前記式(I)においてAがD-Val、R'とR''が共に水素原子、WS7338B物質は前記式(I)においてAがD-allo-Ile、R'とR''が共に水素原子である化合物であることを確認するとともに、それらの合成法を見出した。

かくして、この発明の1つの観点によれば、W

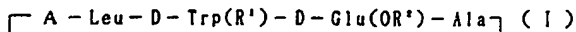
S7338A物質およびWS7338B物質を含む式(I)の化合物及びその塩類の合成による製造法が提供される。

[式(I)の化合物及び塩類の合成]

式(I)の化合物及びその塩類は、式(II)の化合物そのアミノ基もしくはカルボキシ基における反応性誘導体またはその塩類を開環反応に付し、必要に応じてアミノ保護基および／またはカルボキシ保護基の脱離反応に付すことによって合成することができる。



↓



(式中、各略号は前記と同じ意味)

上記の式(I)及び(II)において、R'及びR''aのアミノ保護基としては、アミノ酸およびペプチド化学の分野で使用される常用のアミノ基に対する保護基、すなわち、例えばトリチル、ベンズヒドリル、ベンジル等のアルアルキル基、ジニトロ

フェニル基、例えば1-メトキシカルボニル-1-プロペン-2-イル等の低級アルコキシカルボニル(低級)アルケニル基、例えば1-ベンゾイル-1-プロペン-2-イル等のアロイル(低級)アルケニル基、例えば2-ヒドロキシベンジリデン等のヒドロキシアリ(低級)アルキリデン基、例えばトリメチルシリル基等のトリ(低級)アルキルシリル基、例えばホルミル、アセチル、プロピオニル等の低級アルカノイル基、例えばメシル、エタンスルホニル、プロパンスルホニル等の低級アルカンスルホニル基、例えばエトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、第3級ブトキシカルボニル等の低級アルコキシカルボニル基、例えばベンゾイル、トルオイル等のアロイル基、例えばベンゼンスルホニル、トシル等のアリールスルホニル基等が挙げられる。

R'およびR''aのカルボキシ保護基としては、アミノ酸およびペプチドの化学分野で使用される常用のカルボキシ基に対する保護基が含まれる。例えばメチル、エチル、プロピル等の低級アルキ

ル基、例えばシクロペンチル、シクロヘキシル等のシクロアルキル基、例えばベンジル、置換ベンジル等のアリール基、アルカリ金属、シリル基等が挙げられる。

前記式(Ⅱ)において、アミノ基の反応性誘導体としては、化合物のアミノ基とアルデヒド、ケトン等のようなカルボニル化合物との反応によって精製するシッフの塩基型イミノまたはそのエナミン型互変異性体；化合物のアミノ基とビス(トリメチルシリル)アセトアミド、モノ(トリメチルシリル)アセトアミド、ビス(トリメチルシリル)尿素等のようなシリル化合物との反応によって生成するシリル誘導体；化合物のアミノ基と三塩化燐またはホスゲンとの反応によって生成する誘導体等が挙げられる。

さらに、カルボキシ基における反応性誘導体としては、酸ハロゲン化物、酸無水物、活性化アミド、活性化エステル等が挙げられる。好ましくは、酸塩化物；酸アジ化物；脂肪族カルボン酸（例、酢酸、プロピオン酸、酪酸、トリクロロ酢酸等）

1-アルコキシ-1-クロロエチレン；エチルポリホスフェート；イソプロピルポリホスフェート；オキシ塩化リン；三塩化リン；チオニルクロリド；オキサリクロリド；トリフェニルホスフィンと四塩化炭素もしくはジアゼンカーボキシレートとの組み合わせ；2-エチル-7-ヒドロキシベンズイソキサゾリウム塩；2-エチル-5-( $\alpha$ -スルホフェニル)イソキサゾリウムヒドロキシド分子内塩；1-(*p*-クロロベンゼンスルホニルオキシ)-6-クロロ-1*H*-ベンゾトリアゾール；1-ヒドロキシベンゾトリアゾール；*N,N*-ジメチルホルムアミドとチオニルクロリド、ホスゲン、オキシ塩化リン等との反応によって調製したいわゆるビルスマイヤー試薬等が挙げられる。

この縮合剤の存在下の反応は、反応に悪影響を与えないような通常の有機溶媒（例えばジクロロメタン、メタノール、エタノール、プロパノール、アセトニトリル、ピリジン、*N,N*-ジエチルホルムアミド、4-メチル-2-ペンタノン、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、キシレン等ま

または芳香族カルボン酸（例、安息香酸等）との混合酸無水物；対称酸無水物等が挙げられる。これらの反応性誘導体は使用すべき化合物の種類により、上記のものから選択することができる。

式(Ⅱ)の化合物、その反応性誘導体またはその塩から、式(Ⅰ)の化合物、その反応性誘導体、またはその塩への閉環反応は、通常の方法、例えば加熱または縮合剤の存在下で行われる。

好ましい縮合剤としては、カルボジイミドまたはその塩〔例えば、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド、*N*-シクロヘキシル-*N'*-モルホリノエチルカルボジイミド、*N*-シクロヘキシル-*N'*-(4-ジエチルアミノシクロヘキシル)カルボジイミド、*N*-エチル-*N'*-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドまたはその塩酸塩等〕；*N,N'*-カルボジイミダゾール、*N,N'*-カルボニルビス(2-メチルイミダゾール)；ケテンイミン化合物（例えばペンタメチレンケテン-*N*-シクロヘキシルイミン、ジフェニルケテン-*N*-シクロヘキシルイミン等）；エトキシアセチレン；

またはそれらの混合溶（媒）中で行われる。また、反応温度は特に限定されないが、通常冷却下ないし加温下に行われる。

さらに、加熱下における閉環反応は、上記のような有機溶媒中で、使用した溶媒の沸点以下に加熱して行なうことができる。

閉環反応によって生成した化合物は、必要に応じ、脱保護反応に付される。脱保護反応は、アミノ保護基、カルボキシ保護基の種類に応じて、アミノ酸およびペプチドの化学の分野で公知の手段を適宜選択、利用することによって行なうことができる。

アミノ保護基の脱離反応は、加水分解、還元等のような常法に従って行われる。

加水分解は塩基、またはルイス酸を含めた酸の存在下に行なうのが好ましい。好適な塩基としては、例えばナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、例えばマグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属、それらの金属の水酸化物、炭酸塩または炭酸水素塩、例えばトリメチルアミン、トリエ



チルアミン等のトリアルキルアミン、ピコリン、1,5-ジアザビシクロ[4.3.0]ノン-5-エン、1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデス-7-エン等のような無機塩基および有機塩基が挙げられる。

好適な酸としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、フッ化水素酸等の無機酸および例えばピリジン塩酸塩の酸付加塩等が挙げられる。

例えばトリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等のトリハロ酢酸等のようなルイス酸をしようする脱離は、例えばアニソール、フェノール等の陽イオン捕獲剤の存在下に行なうのが好ましい。

反応は通常、水、例えばメタノール、エタノール等のアルコール、塩化メチレン、クロロホルム、テトラクロロメタン、テトラヒドロフラン、それらの混合物のような溶媒中で行われるが、反応に悪影響を及ぼさない溶媒であればその他のいかなる溶剤中でも反応を行なうことができる。液状の

元鉄、ラネー鉄等の鉄触媒、例えば還元銅、ラネー銅、ウルマン銅等の銅触媒等のような常用の触媒である。

還元は通常、水、メタノール、エタノール、プロパノール、N,N'-ジメチルホルムアミドのような反応に悪影響を及ぼさない常用の溶媒中、またはそれらの混合物で行われる。

さらに、化学的還元を使用される上記酸が液体である場合にはそれらも溶媒として使用することができる。さらにまた、接触還元を使用される好適な溶媒としては、上記溶媒およびその他ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン等のような常用の溶媒またはそれらの混合物が挙げられる。

次に、カルボキシ保護基の脱離反応は、例えば加水分解、還元、ルイス酸を使用する脱離等のカルボキシ保護基の脱離反応に使用される常法が適宜選択利用される。カルボキシ保護基がエステルである場合には保護基は加水分解またはルイス酸を使用する脱離によって脱離することができる。加

塩基または酸も溶剤として使用することができる。

反応温度は特に限定されず、通常冷却下ないし加熱下に反応を行うことができる。

脱離反応に適用できる還元法としては化学的還元と接触還元とが挙げられる。

化学的還元を使用される好適な還元剤は、例えばスズ、亜鉛、鉄等の金属または例えば塩化クロム、酢酸クロム等の金属化合物と、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸、塩酸、臭化水素酸等の有機酸または無機酸との組合わせである。

接触還元を使用される好適な触媒は、例えば白金板、白金海绵、白金黒、コロイド白金、酸化白金、白金線等の白金触媒、例えばパラジウム海绵、パラジウム黒、酸化パラジウム、パラジウム-炭素、コロイドパラジウム、パラジウム-硫酸バリウム、パラジウム-炭酸バリウム等のパラジウム触媒、例えば還元ニッケル、酸化ニッケル、ラネーニッケル等のニッケル触媒、例えば還元コバルト、ラネーコバルト等のコバルト触媒、例えば還

水分解は塩基または酸の存在下に行なうのが好ましい。

好適な塩基および酸としては、アミノ保護基の脱離反応を挙げたものが利用できる。この加水分解は通常有機溶媒、水またはそれらの混合溶媒中で行われる。

反応温度は特に限定されず、カルボキシ保護基の種類および脱離法の種類によって適宜選択すればよい。

ルイス酸を用いる脱離は置換されたまたは非置換アル(低級)アルキルエステルの脱離に好ましく、化合物(Ig)またその塩を例えば三塩化ホウ素、三フッ化ホウ素等の三ハロゲン化ホウ素、例えば四塩化チタン、四臭化チタン等の四ハロゲン化チタン、例えば四塩化スズ、四臭化スズ等のハロゲン化スズ、例えば塩化アルミニウム、臭化アルミニウム等のアルミニウムハロゲン化物、例えばトリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等のトリハロ酢酸等のルイス酸と反応させることにより行われる。この脱離反応は例えばアニソール、フェ

ノール等の陽イオン補足剤の存在下に行なうのが好ましく、通常例えばニトロメタン、ニトロエタン等のニトロアルカン、例えば塩化メチレン、塩化エチレン等のハロゲン化アルキレン、ジエチルエーテル、二硫化炭素のような溶剤中で行われるが、反応に悪影響を及ぼさない溶媒であればその他のいかなる溶媒中でも反応を行なうことができる。これらの溶媒はそれらの混合物を使用してもよい。

還元による脱離は、例えば2-ヨードエチルエステル、2,2,2-トリクロロエチルエステル等のハロ（低級）アルキルエステル、例えばベンジルエステル等のアル（低級）アルキルエステル等のような保護基の脱離に適用するのが好ましい。

脱離反応に適用されうる還元法としては、例えば亜鉛、亜鉛アマルガム等の金属または例えば塩化クロム、酢酸クロム等のクロム化合物の塩と、例えば酢酸、プロピオン酸、塩酸等の有機酸または無機酸との組合わせを用いる還元；および例えばパラジウム-炭素、ラネーニッケル等の常用の

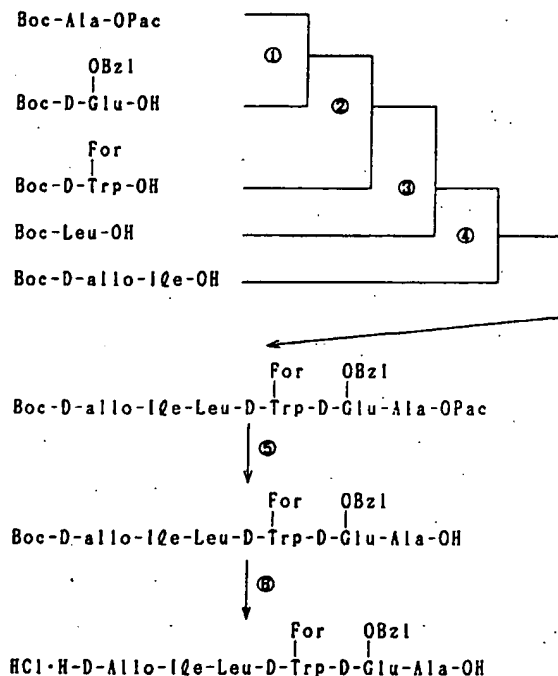
金属触媒の存在下における常用の触媒還元がその例として挙げられる。

反応温度は特に限定されないが、通常は冷却下、常温または加温下に反応が行われる。

次いで、生成した化合物は、粉碎、再結晶、クロマトグラフィー、再沈殿等のような常法により単離、精製することができる。

なお、上記の反応に用いる原料物質の式(II)の化合物、その反応性誘導体またはその塩は、公知の原料から作ることができる。式(II)において、AがD-allo-Ile、R<sup>1</sup>aがホルミル基、R<sup>2</sup>aがベンジル基である化合物を例にとり、その製法を以下に示す。

(以下余白)



[式中Bocは第3級ブトキシカルボニル基、Forはホルミル基、Bzlはベンジル基、Pacはフェナシル基を意味する]

上記①～④の各反応は、夫々アミノ保護基の脱

離反応と縮合反応からなる。すなわち、各反応においては、まず原料化合物の一方（上記反応工程図で上位にある化合物）を、アミノ保護基の脱離反応に付し、ついで、下位にある化合物との縮合反応に付される。アミノ保護基の脱離反応は、前記と同様に行なうことができる。また、縮合反応も前記閉環反応と同様に行なうことができる。

さらに、⑤の反応はアミノ保護基の脱離反応であり、⑥の反応はカルボキシ保護基の脱離反応で、これらの脱保護反応は前記と同様に行なうことができる。

なお、式(I)の化合物の脱保護反応は、一般にアルカリ性条件下で行なうのが望ましい。①～④における脱保護反応及び⑤、⑥の脱保護反応では、所望の脱離基のみが脱離されるようになるべく酸性条件下で行なうのが望ましい。

上記の式(II)の化合物の製造を、特定の例を用いて説明したが、AがD-Val、R<sup>1</sup>aとR<sup>2</sup>aが他の保護基の場合でも同様に製造できることは理解

されるであろう。

この発明の式(1)の化合物の塩としては、医薬的に受容な塩が好ましい。式(1)の化合物の塩は、例えば式(1)の化合物を塩基で処理することにより製造することができる。

適切な塩基としては、アルカリ金属(例えばナトリウム、カリウム等)、アルカリ土類金属(例えば、マグネシウム、カルシウム等)、それらの水酸化物または炭酸塩、アルカリ金属アルコキシド(例えば、ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド、カリウム3級ブトキシド等)等が挙げられる。

式(1)の化合物及びその塩類は、エンドセリン拮抗作用を有し、すなわち末梢循環不全による高血圧症；狭心症、心筋症、動脈硬化症、心筋硬塞等のような心臓病；レーノー病；大脳動脈れん縮、大脳虚血、クモ膜下出血後の後期大脳れん縮等のような大脳発作；気管支縮合等のようなぜん息；急性腎不全のような腎不全等の治療または予防に血管拡張剤として用いることができる。

はIUPAC-IUB(生化学命名法委員会)による略号で示し、さらに下記略号を使用した。

Boc: 第3級ブトキシカルボニル

Bzl: ベンジル

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

Pac: フェナシル( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCH}_2\text{—}$ )

For: ホルミル

WSCD: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド

#### 実施例1(培養によるWS7338物質の製造)

水性培養地160 $\mu\text{L}$ [可溶性澱粉1%, 蔗糖1%, ブドウ糖1%, 綿実粉1%, ペプトン0.5%, 大豆粉0.5%, 炭酸カルシウム0.1%; 6N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整]を20個のマイヤーフラスコ(500 $\mu\text{L}$ )各々に注入し、120℃で30日間滅菌した。

斜面培養したストレプトミセス7338菌株(FERM BP-2500)を各培地に1白金耳ずつ接種し、回転振盪器(220rpm, 5.1cm工程)で、30℃で3日間培養した。

この発明の式(1)の化合物またはその塩類は、経口的または非経口的に用いることができる。投与剤型としては、錠剤、ペレット剤、カプセル剤、顆粒剤、水剤、乳剤、懸濁剤、注射剤等が挙げられる。これらの投与剤型は、それぞれの剤型に適した有機もしくは無機の担体または賦形剤、必要に応じ加えられる他の種々の添加剤を用い、常法に従って作ることができる。

この発明の式(1)の化合物またはその塩類は、ヒトへの投与には静脈内注射もしくは筋肉内注射による非経口投与、または経口投与が一般に好ましい。

投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、静脈内注射の場合は、1回の投与量は、0.1~100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 、筋肉内注射の場合は、0.1~100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 、経口投与の場合には、1日投与量が0.1~100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ である。

#### [実施例]

この発明を実施例によって説明する。

なお、アミノ酸、ペプチド、保護基、縮合剤等

得られた培養液を、ステンレス製ジャー醗酵槽(200 $\text{L}$ )中の滅菌した醗酵培地160 $\text{L}$ [澱粉2%, グルテン0.2%, 肉粉0.5%, 綿実粉0.3%, 乾燥酵母0.1%]に接種した。

30℃で3日間、通気量160 $\text{L}/\text{分}$ 、攪拌数200rpmで培養を行なった。培養液中のWS7338物質は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(B2655型)により定量した。このクロマトグラフィーには、リクロスフィア(Lichrosphere)RP-18(メルク社製)を詰めたステンレスカラム(内径4.0mm, 長さ250mm)を用い、1.0 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流量で、移動相として5mMセチルトリメチルアンモニウムブロミド中45%アセトニトリル-50mMリン酸緩衝液(pH7.0)の混合液を用いた。1.0 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で、WS7338A物質とWS7338B物質の保持時間は各8.9分と12.4分であった(UV230nmで検出)。

なお、HPLC用試料は、培養液にアセトンの等量を加えて激しく攪拌し、1時間放置した後、遠心分離し、調製した。上澄液5 $\mu\text{L}$ をHPLC(B2655型)に付した。

## (ii)分離と精製

得られた培養液(100ℓ)を、珪藻土(1kg)を用いて濾過した。菌糸体塊をアセトン30ℓで処理し、60分間攪拌した。菌糸体の抽出液(30ℓ)を水30ℓで希釈した。その溶液を、活性炭素のカラム(3ℓ)に通し、水15ℓで洗浄後、活性画分を0.2%アンモニア含有の80%アセトン水溶液10ℓで溶出した。溶出液を6N塩酸でpH7.0に調整し、n-ヘキサン10ℓで洗浄した。ヘキサン層を除去した後、溶出液を6N塩酸でpH2.0に調整し、酢酸エステル10ℓで抽出した。抽出液を減圧下で濃縮し、粗粉末(2g)を得た。この粉末を0.1%アンモニア水(20mg/ℓ)100ℓに溶解し、予め充填したカラム(リクロブリーブ(LiChroprep)RP-18, 40-63μm, 内径25mm, 長さ310mm, 4μm)を用い、5mMセチルトリメチルアンモニウムブロミドを含有する45%アセトニトリル-50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出した。最初に溶出される活性画分(画分A)1ℓはWS7338A物質を含有し、次の活性画分(画分B)はWS7338B

物質を含有した。画分A1ℓをダウエックス50W(H型)カラム、ついでSP-207カラム(50μℓ)に通過させ、水500μℓで洗浄後、80%メタノール200μℓで溶出した。活性画分を減圧下で濃縮し、WS7338A物質62mgを白色の純粉末として得た。次に、画分B2ℓをダウエックス50Wカラム(H型, 400μℓ)に付した。活性画分を減圧下で濃縮し、WS7338B物質(92mg)を白色の純粉末として得た。

WS7338物質の物理化学的性質:

(i)WS7338A物質:

外観: 白色粉末

性質: 酸性物質

分子式:  $C_{30}H_{41}N_3O_7$

元素分析:  $C_{30}H_{41}N_3O_7 \cdot H_2O$ として

理論値: C, 58.43; H, 7.19; N, 13.63(%)

実測値: C, 58.83; H, 7.13; N, 13.33(%)

分子量:

FAB-MS m/z 621(M+Na)<sup>+</sup>

HRFAB-MS m/z 621.3027

[理論値: 621.3013( $C_{30}H_{41}N_3O_7 + Na$ )]

溶解性

ジメチルスルホキシド、アンモニア水溶液に可溶

水、メタノールに難溶

クロロホルム、ヘキサンに不溶

呈色反応:

ヨウ素蒸気反応、硫酸セリウム反応、エールリッ

ヒ反応: 陽性

ニンヒドリン反応、モーリッシュ反応、ドラージェンドルフ試薬、塩化第二鉄反応: 陰性

薄層クロマトグラフィー(TLC):

固定相	展開溶媒	Rf値
シリカゲルプレート*	酢酸エチル:メタノール:28% 7%水溶液(12:4:1)	0.21
RP-18**	7%トリメチルセチルアンモニウム 7%塩化セリウム 中の50mMリン酸緩衝液 (pH7.0)(45:55)	0.34

\*シリカゲルプレート: キーゼルゲル60F<sub>254</sub>(メルク社製)

\*\*逆相TLC用シリカゲルプレート: RP-18W F<sub>254</sub>S(メルク社製)

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm(ε): 280(5,700), 289(4,800)

UVλ<sub>max</sub> (MeOH+HCl) nm: 280, 289

UVλ<sub>max</sub> (MeOH+NaOH) nm: 280, 289

IRλ<sub>max</sub> (KBr): 3270, 2950, 1700, 1650, 1635, 1540,

1440, 1380, 1340, 1220, 1170, 1150,

1090, 1000cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ: 10.80(1H, br, d, J=2Hz),

8.76(1H, d, J=8Hz), 8.70(1H, d, J=8Hz), 8.54(1H, d, J=7Hz),

7.53(1H, d, J=8Hz), 7.51(1H, d, J=8Hz), 7.40(1H, d, J=7Hz),

7.32(1H, d, J=8Hz), 7.12(1H, d, J=2Hz), 7.04(1H, m), 6.96

(1H, m), 4.45(1H, m), 4.21-4.23(2H, m), 4.16-4.09(2H, m),

3.26(1H, dd, J=14Hz, 3Hz), 2.92(1H, dd, J=14Hz, 12Hz), 2.15

(2H, m), 1.87(2H, m), 1.78(1H, m), 1.24-1.18(2H, m), 1.13

(3H, d, J=7Hz), 1.02(1H, m), 0.83(3H, d, J=7Hz), 0.81(3H, d,

J=7Hz), 0.74(3H, d, J=6.5Hz), 0.63(3H, d, J=6.5Hz).

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz) δ: 174.0(s), 172.0(s), 171.9

(s), 171.6(s), 170.4(s), 136.3(s), 127.1(s), 123.8(d),

120.9(d), 118.4(d), 118.2(d), 111.4(d),  
110.7(s), 57.4(d), 55.3(d), 52.4(d), 52.2(d), 47.4(d),  
38.8(t), 30.9(d), 30.3(t), 27.4(t), 27.0(t), 24.0(d),  
22.4(q), 22.2(q), 19.2(q), 18.3(q), 14.5(q).

アミノ酸分析:

WS7338A(1mg)を封管中、0.2% 3-(2-アミノエチル)  
インドール含有の4Nメタンスルホン酸(0.4ml)で115℃、  
48時間加水分解した。

アミノ酸分析の結果

Glu(1), Ala(1), Val(1), Leu(1), Trp(1).

(ii)WS7338B物質:

外観: 白色粉末

性質: 酸性物質

分子式:  $C_{21}H_{22}N_2O_7$

元素分析:  $C_{21}H_{22}N_2O_7 \cdot 1/2H_2O$ として

理論値: C, 59.89; H, 7.30; N, 13.52(%)

実測値: C, 60.13; H, 7.14; N, 12.47(%)

分子量:

FAB-MS  $m/z$  635 ( $M + Na$ )<sup>+</sup>

HRFAB-MS  $m/z$  635.3167 ( $M + Na$ )<sup>+</sup>

\*シリカゲルプレート: キーゼルゲル60F<sub>254</sub> (メル  
ルク社製)

\*\*逆相TLC用シリカゲルプレート: RP-18W  
F<sub>254</sub>S (メルルク社製)

UVλ<sub>max</sub> (MeOH) nm(ε): 280(5,700), 289  
(4,700)

UVλ<sub>max</sub> (MeOH+HCl) nm: 280, 289

UVλ<sub>max</sub> (MeOH+NaOH) nm: 280, 289

IRλ<sub>max</sub> (KBr): 3270, 2950, 1700, 1650, 1635,  
1540, 1440, 1380, 1340, 1220,  
1170, 1150, 1090, 1000cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz) δ: 10.79(1H, br. d,  
J=2Hz), 8.77(1H, d, J=8Hz), 8.74(1H, d, J=8Hz),  
8.59(1H, d, J=7Hz), 7.52(1H, d, J=8Hz), 7.50(1H,  
d, J=7Hz), 7.45(1H, d, J=9Hz), 7.31(1H, d, J=8Hz),  
7.12(1H, d, J=2Hz), 7.05(1H, m), 6.96(1H, m),  
4.46(1H, m), 4.32-4.24(3H, m), 4.07(1H, m),  
3.28(1H, m), 2.90(1H, m), 2.16(2H, m), 1.89(2H,  
m), 1.89(2H, m), 1.58(1H, m), 1.30(1H, m), 1.20  
(2H, m), 1.13(3H, d, J=7Hz), 1.08(1H, m), 0.96

[理論値: 635.3169 ( $C_{21}H_{22}N_2O_7 + Na$ )]

溶解性:

ジメチルスルホキシド, アンモニア水溶液に可溶  
水, メタノールに難溶

クロロホルム, ヘキサンに不溶

呈色反応:

ヨウ素蒸気反応, 硫酸セリウム反応, エールリッヒ反応:

陽性

ニンヒドリン反応, モーリッシュ反応, ドラージェンドルフ

試薬, 塩化第二鉄反応: 陰性

薄層クロマトグラフィー(TLC):

固定相	展開溶媒	R <sub>f</sub> 値
シリカゲルプレート*	クロロホルム:メタノール:28% 77モニ7水溶液(12:4:1)	0.21
RP-18**	7ヒトトリル:5mMヒ トリフル77モニ7水溶液 中の50mMリン酸緩衝液 (pH7.0)(45:55)	0.30

(1H, m), 0.87(3H, t, J=7Hz), 0.78(3H, d, J=7Hz),  
0.73(3H, d, J=6.5Hz), 0.63(3H, d, J=6.5Hz).

<sup>13</sup>C-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz) δ: 173.9(s), 172.4  
(s), 172.0(s), 171.6(s), 170.3(s), 136.3(s),  
127.0(s), 123.8(d), 120.9(d), 118.4(d),  
118.1(d), 111.4(d), 110.7(s), 55.6(d), 55.2  
(d), 52.5(t), 52.4(d), 47.4(d), 38.7(t),  
37.4(d), 30.3(t), 27.4(t), 26.9(t), 26.0(t),  
23.9(d), 22.5(q), 22.1(q), 14.7(q), 14.4(q),  
11.5(q).

アミノ酸分析:

WS7338A(1mg)を封管中、0.2% 3-(2-アミノ  
エチル)インドール含有の4Nメタンスルホン酸  
(0.4ml)で115℃、48時間加水分解した。混合  
物を水酸化ナトリウムで中和して、日立835型  
自動アミノ酸分析計で分析した。

アミノ酸分析の結果

Glu(1), Ala(1), Leu(1), allo-Ile(1), Trp(1)

実施例2 (Boc-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

Boc-D-Glu(OBzl)-OH(16.8g)、HCl·H-Ala-OPac(11.0g)及びHOBt(7.32g)の塩化メチレン溶液(200ml)に、WSCD(8.41g)を0℃で加え、混合物を同温度で3時間攪拌した。溶媒を除去後、残渣を酢酸エチル(600ml)に溶解した。その溶液を5%塩酸、1M炭酸水素ナトリウム溶液及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水芒硝で乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸エチル(100ml)とエーテル(300ml)から再結晶して、標題化合物(19.1g, 80.4%)を得た。  
mp 122~125℃, Rf値: 0.72 (ベンゼン: 酢酸エチル: 酢酸, 20:20:1, v/v)。

#### 実施例3 (HCl·H-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

実施例2で得た化合物(Boc-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac)(13.4g)のトリフルオロ酢酸(50ml)とアニソール(5ml)の溶液を水冷下1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を留去後、残渣に4N塩酸のジオキサン(25.5mmol)を加え、混合物を10分間攪拌し、減圧濃縮した。残渣を乾燥エーテル

Boc-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例4の化合物)(4.00g)のトリフルオロ酢酸(95ml)とアニソール(5ml)の溶液を、水冷下1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を留去した後、残渣に4N塩酸のジオキサン(13.0mmol)を加え、混合物を10分間攪拌し、減圧濃縮した。残渣を乾燥エーテルでトリチュレートして標題化合物(3.46g, 99.7%)を得た。mp 227~229℃, Rf値: 0.27。

#### 実施例6 (Boc-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

Boc-Leu-OH(1.30g), HCl·H-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例5の化合物)(3.20g)及びHOBt(0.77g)のN,N-ジメチルホルムアミド(80ml)溶液にWSCD(0.88g)を0℃で加えた。反応混合物を同温度で一夜攪拌した後、減圧で濃縮した。残渣を酢酸エチル(200ml)に溶解し、溶液を5%塩酸、1M炭酸水素ナトリウム溶液及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチ

ルでトリチュレートして標題化合物(11.7g, 99.2%)を得た。mp 112~116℃, Rf値: 0.49。

#### 実施例4 (Boc-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

Boc-D-Trp(For)-OH(3.95g), HCl·H-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例3の化合物(5.00g))及びHOBt(1.76g)のN,N-ジメチルホルムアミド(200ml)溶液に、WSCD(2.02g)を0℃で加えた。反応混合物を同温度で3時間攪拌した。溶媒を留去後、残渣を酢酸エチル(500ml)に溶解し、5%塩酸、1N炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル(40ml)とエーテル(500ml)から再結晶し、標題化合物(8.85g, 85.6%)を得た。mp 176~178℃, Rf値: 0.72 (10%メタノールのクロロホルム溶液)。

#### 実施例5 (HCl·H-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

ル(100ml)とエーテル(200ml)から再結晶し、標題化合物(3.89g, 96.3%)を得た。mp 160~162℃, Rf値: 0.80。

#### 実施例7 (HCl·H-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

Boc-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例6の化合物, 3.50g)のトリフルオロ酢酸(30ml)及びアニソール(3ml)の溶液を水冷下1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を留去後、4N塩酸ジオキサン(10.0mmol)を残渣に加え、混合物を10分間攪拌し、減圧で濃縮した。残渣を乾燥エーテルでトリチュレートし、標題化合物(3.20g, 98.8%)を得た。mp 108~112℃, Rf値: 0.41。

#### 実施例8 (Boc-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPacの製造)

Boc-D-allo-Ile-OH(0.966g), HCl·H-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例7の化合物, 3.00g)及びHOBt(0.616g)のN,N-ジメチルホル

ムアミド(80 $\mu$ l)溶液にWSCD(0.708g)を0℃で加えた。反応混合物を同温度で一夜攪拌した後、減圧で濃縮した。残渣を酢酸エチル(200 $\mu$ l)に溶解し、5%塩酸、1M炭酸水素ナトリウム溶液、及び飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧で濃縮した。残渣を酢酸エチル(10 $\mu$ l)とエーテル(50 $\mu$ l)から再結晶し、標題化合物(3.44g, 93.5%)を得た。mp 175~177℃, Rf値: 0.82。

実施例9 (Boc-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OHの製造)

Boc-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OPac(実施例8の化合物, 3.00g)をN,N-ジメチルホルムアミド(20 $\mu$ l)と酢酸(20 $\mu$ l)の混合液に溶解し、Zn末(3.0g)を室温で加えた。混合物を同温度で1時間攪拌した後、不溶物を濾去して減圧濃縮した。残渣をエーテル(50 $\mu$ l)とn-ヘキサン(100 $\mu$ l)から再結晶して、標題化合物(2.52g, 95.8%)を得た。mp 146-150℃, Rf値: 0.49

℃で一夜攪拌した後、減圧下濃縮した。残渣を酢酸エチル(200 $\mu$ l)に溶解した後、5%塩酸、1M炭酸水素ナトリウム溶液及び飽和食塩水で順次洗浄した。生じた沈殿物を濾過し、酢酸エチルで洗浄して標題化合物(669 $\mu$ g, 89.7%)を得た。mp 294℃(分解), Rf値: 0.57。

実施例12 [D-allo-Ile-Leu-D-Trp-D-Glu-Ala]の製造

実施例11の化合物(620 $\mu$ l)をN,N-ジメチルホルムアミド(30 $\mu$ l)に溶解し、1M水酸化ナトリウム溶液(8.48 $\mu$ l)を水冷下加えた。反応混合物を室温で15分間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をジメチルスルホキシド(10 $\mu$ l)に溶解した溶液に5%塩酸(100 $\mu$ l)及び酢酸エチル(200 $\mu$ l)を加えた。生じた沈殿を濾取し、水及びエーテルで洗浄して標題化合物(433 $\mu$ g, 83.3%)を得た。mp 268℃(分解)

FAB-MS m/z 613(M+H)<sup>+</sup>

[理論値 613.75 (C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>+H)]

Rf値: 0.21 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH: 28%アンモニア水

(CHCl<sub>3</sub>: MeOH: AcOH, 20:2:1, v/v)。

実施例10 (HCl-H-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OHの製造)

Boc-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OH(実施例9の化合物, 1.00g)のトリフルオロ酢酸(25 $\mu$ l)とアニソール(2.5 $\mu$ l)溶液を水冷下1時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を除去後、残渣に4N塩酸のジオキサン(11.8 $\mu$ l)を加え、混合物を10分間攪拌し、減圧濃縮した。残渣を乾燥エーテルでトリチュレートし、標題化合物(833 $\mu$ g, 89.9%)を得た。mp 132-136℃, Rf値: 0.36 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH: AcOH, 16:1:1)。

実施例11 [D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala]の製造

HCl-H-D-allo-Ile-Leu-D-Trp(For)-D-Glu(OBzl)-Ala-OH(実施例10の化合物, 800 $\mu$ g)とHOBt(1.38g)のN,N-ジメチルホルムアミド(1000 $\mu$ l)溶液に、WSCD·HCl(1.56g)及びWSCD(317 $\mu$ g)を水冷下加えた。反応混合物を10

溶液, 12:4:1)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -7.0° (c 1.0 DMSO)。

試験例1

(a)粗受容体膜調製:

ブタの大動脈をペルーフリーズ・バイオロギカルズ社(Pel-Freez Biologicals)(米国)から入手し、使用時まで-80℃で貯蔵した。この大動脈(50g)を解凍し、脂肪組織を除去し、はさみで細切し、ついで、緩衝液(0.25M蔗糖, 50mMトリス-HCl, 0.1mM EDTA·4Na) 100 $\mu$ l中ポリトロン(YAMATO Ultra-Disperser MODEL LK-21)で均質化した。ホモジネートを4℃、20分間10,000gで遠心分離した。

形質膜画分を含む上澄液を4℃、60分間100,000gで遠心分離し、得られたペレットを粗膜画分とする。

ペレットを分析用緩衝液[50mMトリス-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF) 1.5 $\mu$ g/ $\mu$ l, バシトラシ

ン $120\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ロイペブシン $12\mu\text{g}/\text{mL}$ 、キモスタ  
チン $6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.1\%$ ウシの血清アルブミン  
(BSA)、 $\text{pH}7.5$ ] $50\text{mL}$ 中に再懸濁した。

大動脈の膜画分を使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で貯蔵し  
た。

(b)調製膜に対する $^{125}\text{I}$ -エンドセリン-1と  
 $^{125}\text{I}$ -エンドセリン-2の結合分析：

$^{125}\text{I}$ -エンドセリン-1または $^{125}\text{I}$ -エンド  
セリン-2 ( $1.67 \times 10^{-11}\text{M}$ ) (アメルシウム、  
比活性： $2000\text{Ci}/\text{mmol}$ )を分析用緩衝液中の大動  
脈膜試料 $50\mu\text{L}$ と共に最終容量 $250\mu\text{L}$ で室温( $20$   
 $\sim 22^{\circ}\text{C}$ )で60分間インキュベートした。

その後インキュベートした混合物をセルハーヴェ  
スター (Cell Harvester, ブランデルM-24S)を  
用いて、GF/Cフィルター (使用前に $0.1\%$ ポリエ  
チレンイミンで3時間予備処理した)で濾過した。  
ついで、フィルターを $0^{\circ}\text{C}$ で洗浄用緩衝液( $50\text{mM}$   
トリス-HCl,  $\text{pH}7.5$ )全 $3\text{mL}$ で10回洗浄した。  
濾液をガンマカウンター (バックード自動ガン  
マ計 5650型)で計数した。

チェンバー (organ chambers)に懸濁し、 $37^{\circ}\text{C}$   
を保持し、かつ $95\% \text{O}_2 / 5\% \text{CO}_2$ の混合ガスを  
通気した。

大動脈は、KClの濃度を増して調製した後、 $1\text{g}$   
の予負荷重を加えた。収縮は等長時の張力増加を  
測定した。

エンドセリン ( $3.2 \times 10^{-9}\text{M}$ )により誘発された  
ウサギの大動脈の収縮応答に対してWS7338物質  
をテストした。合成エンドセリンはペプチド イ  
ンスティテュート社(株)(Peptide Institute Inc.  
大阪)から入手した。エンドセリンにより全収縮  
応答を誘発した後WS7338物質を加えた。

WS7338物質の活性度は、エンドセリンにより  
誘発された最大収縮応答の阻止百分率で表わし、  
第5表に示す。

(以下余白)

その結果を第4表に示す。

第4表 プタの大動脈膜中で $^{125}\text{I}$ -エンドセ  
リン-1及び $^{125}\text{I}$ -エンドセリン-2の特定結  
合に対するWS7338物質の作用

試験化合物	$1\text{Ci}/\text{mL}$ (M)	
	$^{125}\text{I}$ -エンドセリン-1	$^{125}\text{I}$ -エンドセリン-2
WS7338A物質	$9.3 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-6}$
WS7338B物質	$2.7 \times 10^{-7}$	$4.8 \times 10^{-7}$

試験例2 エンドセリン誘発のウサギの大動脈の  
収縮に対するWS7338の作用

ウサギ (アルビノ種、雄、11週令)を屠殺後、  
直ちに大動脈を摘出し、内膜のついたストリップ  
( $2\text{mm} \times 2.5\text{mm}$ 長)に縦断した。脂肪組織を除  
去した後、上記ストリップを、クレープスーリン  
ガー液 ( $113\text{mM NaCl}$ ,  $4.8\text{mM KCl}$ ,  $2.2\text{mM CaCl}_2 \cdot \text{m}$ ,  
 $1.2\text{mM MgCl}_2$ ,  $25\text{mM NaHCO}_3$ ,  $1.2\text{mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  
 $5.5\text{mM}$  グルコース)を入れた $2.5\text{mL}$ のオーガン

第5表 エンドセリン誘発のウサギの胸部大動脈  
の収縮 応答に対するWS7338物質の作用

WS7338物質の 濃度 (M)	エンドセリンの収縮応答に対する 阻止作用 (%)
WS7338A物質	
$1 \times 10^{-9}$	40
$1 \times 10^{-8}$	6.5
WS7338B物質	
$1 \times 10^{-9}$	25.9
$1 \times 10^{-8}$	10.4
$1 \times 10^{-7}$	6.4

上記試験の結果から、WS7338物質は生理活性  
作用、特に抗エンドセリン作用を有することが判  
明した。

代理人 弁理士 野 河 信太郎





第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>

// C 12 P 21/04  
A 61 K 37/24

(C 12 N 1/20  
C 12 R 1:465)  
(C 12 P 21/04  
C 12 R 1:465)  
C 07 K 99:00

識別記号 庁内整理番号

ABN  
ABU  
ACF

8214-4B

8615-4C

⑦発明者	逸見	恵次	茨城県つくば市大字下広岡668番地の37
⑦発明者	関	正博	茨城県つくば市梅園2-15-2
⑦発明者	深見	直喜	茨城県つくば市東光台3-17-1
⑦発明者	橋本	真治	茨城県つくば市竹園2-11-6-408